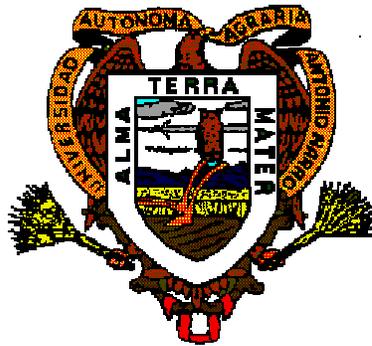


**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**DIVISION DE AGRONOMIA**



**Detección de patógenos presentes en tres especies de semillas forestales  
(*Abies vejari* Martínez, *Pinus culminicola* A&B, y *Picea engelmannii* (Perry)  
Engelm. var. *mexicana* Martínez)**

**Por:**

**ROSALINDA CERVANTES MARTINEZ**

**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO**

**Buenvista, Saltillo, Coahuila, México,**

**Mayo, 2000**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**Detección de patógenos presentes en tres especies de semillas forestales  
(*Abies vejari* Martínez, *Pinus culminicola* A&B, y *Picea engelmannii* (Perry)  
Engelm. var. *mexicana* Martínez).**

**Por:**

**ROSALINDA CERVANTES MARTINEZ**

**TESIS**

**Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO**

**Aprobada por:**

---

**ING. M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Presidente del jurado**

---

**ING. Celestino Flores López  
Sinodal**

---

**ING. Sergio Braham Sabag  
Sinodal**

---

**ING. M.C. Reynaldo Alonso Velasco  
Coordinador de la División de Agronomía**

## INDICE

	Página
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	iii
<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>REVISION DE LITERATURA</b> .....	3
Ecología y Distribución de las Especies .....	3
Importancia de las Especies .....	3
Clasificación Taxonómica, Descripción, Distribución y Usos de las Especies	4
<i>Picea engelmannii</i> var <i>mexicana</i> .....	4
Clasificación taxonómica según Perry (1991) .....	4
Descripción Botánica .....	4
Distribución .....	5
Usos .....	5
<i>Abies vejari</i> .....	6
Clasificación taxonómica según Perry (1991) .....	6
Descripción Botánica .....	6
Habitat de Crecimiento, Distribución y Usos del Género <i>Abies</i> .....	6
<i>Pinus culminicola</i> .....	7
Descripción Botánica .....	7
Distribución .....	7
Usos .....	8
Importancia de la Semilla como Diseminadora de Patógenos .....	8
Patógenos Asociados a Coníferas .....	9
Hongos de Conos y Semillas .....	10
Importancia de las Pruebas de Sanidad .....	11
Daños Causados por los Hongos en las Semillas .....	12
Métodos de Detección de Hongos .....	14
Examen de las semillas sin incubación .....	14
Examen de las semillas tras incubación .....	15
Ensayos en papel filtro .....	15
Ensayos en agar .....	15
Ensayos con congelación .....	16
Clasificación de hongos detectados en las semillas .....	16
Bacterias transmitidas por semillas .....	16
Daños Causados a las semillas por bacterias .....	17
Métodos de Detección e Identificación de Bacterias .....	18
Observación visual de semillas secas .....	18
Aislamiento en medio de agar .....	18
Características culturales .....	18
Características fisiológicas y bioquímicas .....	18
Cultivo de plantas y plántulas .....	19
Medios nutritivos .....	19
Métodos serológicos .....	19

Técnica del Bacteriófago . . . . .	19
Clasificación de bacterias detectadas en las semillas . . . . .	20
Germinación . . . . .	20
Usos de las Pruebas de Germinación y de Vigor de la Semilla . . . . .	21
Pruebas de Germinación . . . . .	22
Plántulas normales . . . . .	23
Plántulas anormales . . . . .	24
Análisis de Pureza . . . . .	25
Calidad de la Semilla . . . . .	26
Viabilidad . . . . .	28
Tratamientos Especiales Activar la Germinación . . . . .	29
Escarificación . . . . .	29
Estratificación . . . . .	30
Inmersión en agua fría o caliente . . . . .	30
Presecado . . . . .	30
Substancias químicas . . . . .	30
Factores que influyen en la Germinación . . . . .	31
Factores internos. . . . .	31
Factores ambientales . . . . .	31
Pruebas de Patogenicidad . . . . .	32
Pruebas rápidas de patogenicidad . . . . .	32
<b>MATERIALES Y METODOS</b> . . . . .	<b>34</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> . . . . .	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	<b>47</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> . . . . .	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	<b>50</b>

## INDICE DE CUADROS

Número		página
1	Efecto del contenido de humedad sobre la viabilidad y plagas de semillas almacenadas . . . . .	27
2	Muestras de semillas de tres especies de coníferas ( <i>Abies vejari</i> , <i>Pinus culminicola</i> y <i>Picea engelmannii</i> var. <i>mexicana</i> ) . . . . .	34
3	Número de semillas con incidencia de microorganismos detectados en seis muestras de semillas de tres especies de coníferas ( <i>Abies vejari</i> , <i>Pinus culminicola</i> y <i>Picea engelmannii</i> var. <i>mexicana</i> ) . . . . .	42
4	Microorganismos endobióticos y epibióticos (Vázquez y Pineda, 1989) encontrados en seis muestras de tres especies de semillas de coníferas . . . . .	43
5	Evaluación de semillas germinadas, no germinadas, plántulas normales y plántulas anormales . . . . .	44

## RESUMEN

El objetivo principal de éste estudio fue detectar los patógenos presentes en las semillas de *Abies vejari*, *Pinus culminicola* y *Picea engelmannii* var. *mexicana* en diferentes tiempos de almacenamiento y durante la germinación de las mismas. Se analizaron 6 muestras de semilla; M1, M2, M3 Y M6, correspondieron a semilla almacenada y las muestras M4 y M5 a semilla recién colectada de la Sierra La Marta, Municipio de Rayones, N. L. Para esto se realizó, detección de hongos por el método de papel secante, se tomaron 25 semillas de cada especie, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se colocaron 5 semillas en una caja petri con papel filtro húmedo estéril, se hicieron 5 repeticiones; se incubaron a una temperatura de 28°C por un periodo de 5 a 7 días; posteriormente se identificaron con la ayuda de claves. La detección de bacterias por los métodos de papel secante y medios de agar, se hizo de la misma manera que para detectar hongos; después las colonias bacterianas que se presentaron se aislaron, purificaron, se les hizo la tinción de gram y se colocaron en los medios selectivos para determinar el género; posteriormente se hicieron las pruebas bioquímicas para identificar la especie y las pruebas de patogenicidad en zanahoria, papa y plántulas de tomate. También se realizó el análisis de pureza por medio de corrientes de aire a las semillas de *Abies vejari* y *Picea engelmannii* var. *mexicana* y por flotación las semillas de *Pinus culminicola*, y tratamientos para activar la germinación, colocando las semillas de las tres especies en remojo en agua fría, además de utilizar la estratificación para *Abies vejari*. Se colocaron las semillas a germinar en papel germinador utilizando el método de muñecas o tacos, esto se hizo primero para la semilla almacenada y después para la semilla recién colectada; evaluando número de semillas germinadas, no germinadas, plántulas normales y plántulas anormales. Los patógenos detectados fueron los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium fuscum*, *Rhizopus stolonifer* y las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia sp.*

## INTRODUCCION

Entre los grupos de plantas de mayor importancia actual, por la superficie que cubren y desde el punto de vista económico en México y otros países del Hemisferio Norte, destacan las coníferas. Sin embargo, su conocimiento es todavía deficiente, debido al escaso número de personas que se dedican a su estudio, lo cual limita las medidas de conservación y utilización (Madrigal *et al.*, 1993).

La importancia de las coníferas en el mundo se extiende más allá de su uso material de productos forestales, ya que son componentes del ecosistema, cubren una grande porción del Hemisferio Norte, contribuyen al ciclo del carbón y en los niveles de procesos del ecosistema. Proveen hábitat a muchos otros organismos (Hansen y Lewis, 1997).

El deterioro del bosque repercute no solamente en un menor aprovechamiento de madera y otros productos forestales, sino también en menor captación de recursos acuíferos y escasa retención de suelo. Un ecosistema forestal deteriorado induce desajustes en los ciclos hidrológicos regionales durante la época de lluvias ocurren inundaciones en las tierras bajas, así como erosión de los suelos no protegidos por la cubierta vegetal y azolve de presas y depósitos, mientras que durante la temporada seca falta el agua en el subsuelo (García y González, 1998).

Las semillas de los árboles y arbustos constituyen una de las formas más importantes de germoplasma primario, ya que a partir de ellas se lleva a cabo la regeneración natural o artificial de los bosques. Las semillas de los árboles y arbustos forman parte importante de la dieta de numerosas especies de animales incluyendo al hombre.

Ante la continua y creciente destrucción en la que se encuentran amenazados nuestros bosques naturales, en especial aquellos de clima templado-frío y tropical, urge la necesidad de llevar a cabo programas de investigación sobre la biología y manejo de semillas

forestales, en virtud de que esta fuente de material genético constituye la posibilidad que tiene el hombre para ayudar a reconstituir dichos ecosistemas (Niembro, 1980).

Sin embargo, a pesar de la importancia que tienen las semillas de los árboles ya arbustos, su estudio ha sido relegado a un segundo plano (Niembro, 1988).

Además diversas enfermedades atacan flores, frutos y conos de árboles forestales, y las pérdidas de semilla por éstas pueden ser serias en coníferas (Hoekstra *et al.*, 1961).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantean los siguientes OBJETIVOS:

1.- Detección de patógenos presentes en las semillas de *Abies vejari*, en diferentes tiempos de almacenamiento y germinación.

2.- Detección de patógenos presentes en las semillas de *Pinus culminicola* colectada en 1998 y durante la germinación.

3.- Detección de patógenos presentes en las semillas de *Picea engelmannii* var. *mexicana* en diferentes tiempos de almacenamiento y durante la germinación.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Ecología y Distribución de las Especies.**

No podemos decir que las coníferas sean un grupo floreciente. Su máxima expansión sobre la tierra se dio en épocas geológicas pasadas, como se desprende de los resultados de la investigación paleobotánica. El número relativamente grande de géneros monotípicos, aproximadamente la tercera parte de los existentes, así como los endemismos que ahora conocemos, pudieran ser considerados como una prueba más, de que este grupo de plantas hace tiempo que empezó a experimentar una contracción en su área de distribución. No obstante a lo anterior, las coníferas de nuestro tiempo aún conservan buena parte de su importancia en lo que se refiere a la superficie ocupada por sus poblaciones (Madrigal *et al.*, 1993).

El mismo autor menciona que desde el punto de vista taxonómico, las coníferas de nuestros días, en el ámbito mundial, se agrupan en siete familias, cuarenta y ocho géneros y más de 500 especies. Alrededor de un tercio de los géneros son monotípicos y endémicos, los cuales pueden considerarse como apibióticos o relictos, sobrevivientes de una flora predominante en otras épocas. Grandes extensiones de bosques formados por masas puras, casi puras o mezcladas de coníferas, se desarrollan principalmente bajo condiciones más benignas.

### **Importancia de las Especies**

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección.

Las especies aquí estudiadas se encuentran dentro de ésta norma.

Familia	Género	Especie	Categoría
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>culminicola</i>	Pr *
	<i>Abies</i>	<i>vejari</i>	A*
	<i>Picea</i>	<i>mexicana</i>	P

Pr\* = Sujetas a protección especial, endémica.

A\* = Amenazada, endémica.

P = En peligro de extinción.

### **Clasificación Taxonómica, Descripción, Distribución y Usos de las Especies**

#### ***Picea engelmannii* var. *mexicana***

#### **Clasificación taxonómica según Perry (1991).**

Reino ----- Plantae

División ----- Spermatophyta

Subdivisión----- Gymnospermae

Orden ----- Coniferales

Familia ----- Pinaceae

Genero ----- *Picea*

Especie ----- *engelmannii* (Parry) Engelmann

Variedad ----- *mexicana* Martínez.

#### **Descripción Botánica.**

Arbol, de 25 a 30 m. de altura, con tallos monopódicos, con ramas verticiladas. Hojas cuadrangulares punzantes, fácilmente caedizas cuando la ramilla muere, dispuestas

sobre las bases salientes de 2 a 2.5 cm. de largo por 1 a 2 mm. de ancho, solitarias de color verde azulosos, brácteas protegiendo la yema sin cubierta resinosa, de color café claro. Conos colgantes, subcilíndricos, menor de 10 cm. de largo por 2cm de ancho, color café azuloso sin cubierta resinosa, escamas con ápice obtuso. Semillas dos por escama del cono, aladas (Martínez, 1953).

### **Distribución.**

*Picea engelmanni* (Parry) Engelman, se distribuye en las Montañas Rocosas de Colorado, Sur de Arizona, Nuevo Mexico, en las Montañas Cascada de Washington, Oregón, Nueva Inglaterra, Columbia Británica y Alberta, Canada. Es vegetación nativa de regiones alpinas y subalpinas de las Montañas Rocosas de Colorado (Popovich, *et al.*, 1993).

La distribución actual de los bosques de *Picea* en la República Mexicana obviamente constituye un estado relictual, debido a lo pequeño y restringido de las áreas que ocupan (Rzedowski, 1978).

*P. engelmanni* var. *mexicana*, se encuentra arriba de los 3400 m.s.n.m., en la Sierra La Marta considerada como una de las montañas más altas, frías y húmedas de la Sierra Madre Oriental, en el Noreste de México, perteneciente a los municipios de Arteaga, Coah. y Rayones N.L. (Martínez, 1963; Taylor y Patterson, 1980). Aunque se puede encontrar esta especie a los 2800 m.s.n.m. (Capó, 1972). También se encuentra en la Sierra El Coahuilón, Arteaga, Coah., reportado por Braham (1995) y en el cerro Mohinora en Guadalupe y Calvo, Chihuahua (Taylor, *et al.*, 1980).

### **Usos**

Sus usos son muy variados como son: hábitat y alimento para animales de vida silvestre, (USDA, 1974) producción de madera, es de gran importancia en la silvicultura y en las captaciones de agua, citado por Popovich (1993).

## *Abies vejari*

### **Clasificación Taxonómica según Perry (1991).**

Reino----- Plantae  
División ----- Spermatophyta  
Subdivisión----- Gymnospermae  
Orden ----- Coniferales  
Familia ----- Pinaceae  
Género ----- *Abies*  
Especie ----- *vejari* Martínez.

### **Descripción Botánica**

Arbol de 30 a 40 m. de altura por 30 a 50 cm de diámetro de tronco recto; corteza delgada, lisa, color grisáceo, hojas aglomeradas, dispuestas en espiral, gruesas y dirigidas en todos sentidos, con el ápice obtuso de 15 a 20 mm de largo por 1.5 de ancho, color verde claro, yemas globosas muy resinosas. Conos oblongos, erguidos, solitarios y subsésiles, de color violáceo muy oscuro al principio y amarillento después; muy resinoso, de 6 a 8 cm de largo por unos 4 a 4.5 cm de ancho o diámetro, escamas cóncavas, casi triangulares, ápice redondeado, brácteas exertas, presenta dos canales resiníferos. Semillas angostas de 10 mm de largo, con vejigas resinosas, alas delgadas, 22 mm de largo por 12 mm de ancho en la parte superior (Martínez, 1953).

### **Hábitat de Crecimiento, Distribución y Usos del Género *Abies*.**

*Abies* es un género del Hemisferio Norte cerca de 40 especies del árbol siempre verde se establece en el Norte y Centro de América, Asia, Europa y Africa del Norte. Las especies introducidas de Asia y Europa son utilizadas como ornamentales o como árboles de Navidad (Franklin, 1974).

*Abies vejari* se distribuye en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Martínez, 1953).

## *Pinus culminicola*

### **Clasificación Taxonómica según Perry (1991).**

Reino ----- Plantae  
División ----- Spermatophyta  
Subdivisión ----- Gymnospermae  
Orden ----- Coniferales  
Familia ----- Pinaceae  
Género ----- *Pinus*  
Especie ----- *culminicola* Andresen y Beaman.

### **Descripción Botánica**

Arbol de 1-5 m de alto, tronco de 16-25 cm de diámetro, ramificado desde la base, ramas numerosas, largas, torcidas y extendiéndose por el suelo. La corteza es delgada pardo clara, las hojas agrupadas en fascículos de 5, color verde azulado, la superficie ventral glauca, los márgenes enteros, un canal resinífero dorsal; las semillas miden de 4 a 6 mm de longitud de color oscuro y con una cubierta dura, el endospermo es blanco, el número de semillas por cono es de 8 a 11 (Perry, 1991).

*Pinus culminicola* presenta un aspecto arbustivo, pues se ramifica en forma profusa desde la base y crece más a lo ancho que a lo alto, forma un matorral denso y difícilmente penetrable, de 1 a 5 m de altura (Rzedowski, 1983).

### **Distribución**

*Pinus culminicola* se distribuye en el Norte de la Sierra Madre Oriental (Suzán *et al.*, 1991), y fue colectado y descrito del Cerro Potosí que se encuentra a una altura de 3500 m., cerca de Galeana N.L., y por un número de años solamente se encontró en ésta localidad. Más recientemente Riskind y Patterson (1975) reportaron colecciones de la Sierra La Marta al Este de Saltillo, Coahuila, en el Municipio de Arteaga y al Noreste en

las montañas de la Villa San Antonio de las Alazanas. Estas áreas se encuentran aproximadamente a 60 Km. de distancia al Noroeste, Norte y Noreste de el Cerro Potosí (Perry, 1991).

## **Usos**

La semilla es utilizada como alimento por aves y roedores.

Suzán *et al.* (1991), menciona que tiene uso comercial por tener potencial como ornamental.

## **Importancia de la Semilla como Diseminadora de Patógenos**

La transmisión por semillas es un método por excelencia por el cual los patógenos son introducidos dentro de una nueva área geográfica, pueden sobrevivir por periodos sin hospedero, son preferentemente seleccionados y distribuidos en hospederos específicos y son distribuidos a través de la población de plantas como foco de inóculo primario (Horfall y Cowling, 1978).

Numerosas enfermedades de las plantas aparecen por la infección que llevan las semillas. Inicialmente, las pérdidas acontecen en el periodo pre-emergente y por muerte de plántulas; sin embargo, más tarde la dispersión de la enfermedad puede causar la pérdida total o parcial de la cosecha (Moreno y Zamora, 1978).

La infección transmitida por semillas portadoras de bacterias y hongos, es con frecuencia importante como punto inicial de propagación de las enfermedades en el campo; además la determinación de éstos patógenos tiene una relación importante con la cuarentena de las plantas (ISTA, 1959).

La nacencia de las plantas puede verse seriamente perturbada por la acción de microorganismos y, más raramente, por animales. La mayoría de estos microorganismos son hongos; en caso de enfermedades bacterianas de las plantas, si la infección alcanza a las semillas, como sucede con la grasa de las judías, las semillas atacadas germinan mal y si lo

hacen, las plántulas infectadas suelen ser débiles. Los hongos pueden infectar las semillas durante su formación y maduración, en su almacenamiento o bien tras la siembra (Besnier, 1989).

Andersen y Charles (1980), mencionan cuatro grupos de organismos comúnmente asociados con semillas que originan enfermedades de plantas. En orden importancia son: los hongos, bacterias, virus y nemátodos. Algunas otras enfermedades de semillas son resultado de deficiencias de nutrientes de las plantas y de causas indeterminables. Las semillas infectadas con patógenos llevados en ellas, pueden sufrir en el campo una reducción en su población debido a que los patógenos atacan y matan las plántulas.

En forma similar en los laboratorios, la precisión de las pruebas de germinación puede ser afectada por ciertos patógenos llevados en las semillas, los cuales en algunos casos dan lugar a que las plántulas tomen un color café, o bien, durante las pruebas las atacan y las matan.

### **Patógenos Asociados a Coníferas**

En pruebas de germinación realizadas en semillas de *Pinus douglasiana*, *P. michoacana* y *P. pseudostrobus*, se encontraron microorganismos epibióticos como son *Botrytis*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Xanthomonas*; y microorganismos endobióticos: *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Pestalotia* (Vázquez y Pineda, 1989).

El “Commonweath Mycological Institute” de Inglaterra, reporta los siguientes géneros y especies de hongos encontrados en semillas de Pino de Honduras (*Pinus caribea* y *P. oocarpa*) a: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Macrophoma sapinea*, *Penicillium sp.*, *Penicillium citrinum*, *Pestalotiopsis sp.*, *Thomopsis occulta*, *Phomopsis pseudotsuga*, *Rhizopus stolonifera*, *Syncephalastrum racemosum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum*, *Sterile insolate*. El laboratorio “Servicios para la investigación agrícola tropical S.A.” de la Lima- Honduras, C.A. reporta los siguientes géneros: *Mucor*, *Curvularia*, *Fusarium roseum* (Robins y Ochoa, 1983).

*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* en pino, *Diplodia gossypina* y *Diplodia pinea* estos atacan a conos de *Pinus muricata*, *P. nigra*, *P. sabiniana*, *P. silvestris* y Abeto Douglas (Hansen y Lewis, 1997).

Investigaciones realizadas en semillas de conos almacenados del Abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) se implica a los hongos en la pérdida de germinación. Los hongos encontrados en ésta prueba realizada en *P. menziessii* fueron más frecuentes *Gliocladium*, *Penicillium*, *Spicaria* y *Trichoderma*; *Aspergillus* y *Rhizopus* fueron menos frecuentes. También reportan haber observado bacterias en las semillas, pero no se identificaron (Bloomberg, 1969).

Lemus (1999) detectó en semillas de *Pinus catarinae* los siguientes patógenos: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria resedae*, *Rhizopus sp.* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Prochazkova quien hizo ensayos de 8100 lotes de coníferas, establece, especies de *Penicillium* en más del 85 % de los lotes de semilla del Abeto Nórdico; *Aspergillus* en un 73%, 39% en el pino Escocés, *Trichothecium roseum* cerca del 70% de los lotes y *Rhizopus stolonifer* en un 40% (Hansen y Lewis, 1997).

### **Hongos de Conos y Semillas**

Hansen y Lewis (1997) mencionan que muchos hongos saprófitos o débilmente patogénicos se presentan en conos y semillas en la época y proceso, durante la extracción y subsecuentemente durante las pruebas de semilla; también durante el transplante de plántulas, además muchas especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y hongos similares, los cuales son generalizados en conos pero cuyo papel es indefinido.

Dependiendo como invade el hongo, la enfermedad de los conos puede ser húmeda o seca, comúnmente los cubren externamente y algunas veces internamente.

Los hongos se presentan en conos y semillas que tienen un inadecuado manejo durante la colecta o el almacenamiento, conos que han sido almacenados con humedad, sin ventilación o han sido dejados a sobrecalentamiento.

El mismo autor menciona que se presentan “Hongos de frío” especialmente en *Picea* y *Abies*, éstos son llamados así porque crecen a bajas temperaturas, éstos se adquieren cuando los conos entran en contacto con el suelo forestal donde viven los hongos, éstos patógenos han sido reportados que crecen solamente en Norte América, y algunas veces se presentan en Europa.

### **Importancia de las Pruebas de Sanidad**

El solo determinar los porcentajes de pureza varietal y de germinación no es suficiente para expresar el verdadero valor de un lote de semillas; de ahí radica la importancia de efectuar no solamente pruebas de pureza y germinación sino que también se deben observar y registrar la presencia de gérmenes de enfermedades y plagas (ISTA,1959).

El análisis de semillas para pureza y germinación, es una práctica aceptada en muchos países. En años recientes los hombres de ciencia, comerciantes en semillas y productores de ellas, han llegado a reconocer en forma creciente que no basta hacer las pruebas de pureza y germinación, y se hacen necesarios métodos internacionales para descubrir a los organismos más serios que se transmiten en las semillas (Andersen y Charles, 1980).

Moreno (1996) menciona que determinar el estado de sanidad de una muestra de semillas y por consiguiente el del lote, es importante por tres razones que son:

- 1.-El inóculo es portado por la semilla y puede dar lugar al desarrollo progresivo de enfermedades en el campo y reducir el valor comercial del cultivo.

2.- Los lotes de semilla importados pueden introducir enfermedades en nuevas regiones. Por lo tanto, es necesario realizarlas para satisfacer los requerimientos cuarentenarios.

3.- Pueden elucidar la evaluación de las plántulas y las causas de una germinación deficiente o del establecimiento en el campo y por consiguiente suplementar las pruebas de germinación.

### **Daños Causados por los Hongos en las Semillas**

Moreno y Zamora (1978), citan que los tres factores más importantes que afectan la longevidad de la semilla son: contenido de humedad, temperatura y hongos patógenos. Además el desarrollo de los hongos en el grano antes y durante el almacenamiento lleva a reducción en el valor de la cosecha por pérdida de peso y deterioro en la calidad del grano.

Los hongos que se alojan en las semillas causan diferentes daños; si la infección es muy severa, el daño puede ocasionar la muerte del embrión. Con infecciones leves, las semillas no pierden su poder germinativo; sin embargo si puede verse afectado su vigor. Los hongos que invadieron las semillas en el campo reinician su actividad cuando éstas van a germinar, debido a la alta humedad presente en el suelo; algunos de éstos causan la pudrición de las semillas y la marchitez de las plántulas. Muchos hongos no causan problemas a las semillas ni a las plántulas durante su germinación y emergencia, pero son capaces de causar el desarrollo de enfermedades foliares, del tallo o de los frutos, que reducen la cantidad y calidad de las cosechas (Moreno, 1996).

Neergaard (1979) menciona seis principales tipos de pérdidas causadas por crecimiento de hongos en granos almacenados son:

- 1.- Disminución en la germinación
- 2.- Decoloración de partes o de toda la semilla o grano (usualmente el embrión)
- 3.- Calentamiento y enmohecimiento
- 4.- Varios cambios bioquímicos
- 5.- Producción de toxinas que si son consumidos pueden ser peligrosos al hombre y animales domésticos

## 6.- Pérdida en peso.

No hay estadísticas exactas en el mundo sobre la pérdida de granos alimenticios y otras semillas debido a hongos de almacén pero un aproximado y probable porcentaje estimado por la (FAO) es un 5 por ciento de toda la cosecha de granos alimenticios antes del consumo; en algunos Países de Africa y América del Sur, esto puede ser el 30 por ciento de la cosecha anual. El problema de los hongos de almacén (y plagas) es uno de los principales en el mundo de la agricultura (Neergaard, 1979).

Moreno (1996), menciona que dos de los principales daños que ocasionan los hongos de almacén son:

- a) Reducción del poder germinativo de las semillas
- b) Producción de toxinas

Los hongos de almacén *Aspergillus* y *Penicillium* producen otras micotoxinas en cereales, soya y cacahuate que son las ochratoxinas también llamadas nefrotoxinas que pueden causar daño al hígado y riñón, teratogenesis, convulsiones, hemorragias. Malformación en plantas y animales (Alexopoulos *et al.*, 1996).

*Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare, son la excepción más notable de los llamados hongos de almacén ya que tienen la capacidad de invadir a las semillas desde el campo, y producen las potentes toxinas conocidas como aflatoxinas (Moreno, 1996).

Según De la Garza (1996) los granos pueden ser afectados, desde su formación o maduración cuando aún están en el campo; a los microorganismos encontrados se les denomina hongos de campo, aunque pueden detectarse algunas bacterias. Los hongos de almacén generalmente no atacan a los granos y semillas antes de la cosecha en el campo, sus actividades comienzan con el almacenamiento de las semillas y se incrementan paulatinamente; y existe un tercer grupo llamado hongos de deterioro avanzado que incluye a los hongos que colonizan granos y otros productos alimenticios

que han sufrido un deterioro biológico previo, su principal característica es la de ser excelentes degradadores de la materia orgánica; invaden los granos que están bajo pésimas condiciones de almacenamiento.

Hongos de campo (95 a 100 % HR)	Hongos de almacén (65 a 90 % HR)	Hongos de deterioro avanzado (90 a 100 % HR)
<i>Alternaria spp</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>A. restrictus</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>Fusarium sp</i>	<i>A. candidus</i>	<i>Absidia spp</i>
<i>Helminthosporium spp</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Mucor spp</i>
<i>Diplodia maydis</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Rhizopus spp</i>
<i>Cladosporium spp</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>Chaetomium spp</i>
<i>Cephalosporium sp</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>Trichothecium spp</i>
	<i>Spocendonema sebi</i>	

### **Métodos de Detección de Hongos**

#### **Examen de semillas sin incubación**

Se realiza un examen individual de las semillas secas utilizando una lupa o un microscopio de disección con los cuales se puede observar la infección de ciertos patógenos, particularmente aquéllos que producen síntomas característicos como son decoloración, malformación, necrosis o estructuras fructíferas. Generalmente la ausencia de síntomas no indica la ausencia de patógenos (Dhingra y Sinclair, 1995).

Diversos hongos patógenos de semillas pueden ser detectados por inspección visual de la semilla (Copeland y McDonald, 1985).

### **Examen de las semillas tras incubación.**

Los métodos de examen con incubación se utilizan casi exclusivamente para detectar las infecciones causadas por hongos. La incubación consiste en el mantenimiento de las semillas en condiciones ambientales favorables al desarrollo de los hongos, con la aparición de abundante micelio y gran esporulación.

Las semillas se colocan en dos tipos principales de soportes: Papel filtro y agar; se mantienen en ambiente húmedo, a temperaturas de 20°-22°C (para las especies propias de climas templados) durante varios días, y según los casos, en la oscuridad o bajo regímenes de 12 horas de luz y oscuridad (Besnier, 1989).

### **Ensayos en papel filtro.**

Debe colocarse suficiente papel empapado, pero no saturado de agua, para que proporcione humedad suficiente sin tener que añadir agua durante el tiempo de incubación; en ciertos casos es necesario detener el proceso de germinación, esto se hace tratando las semillas con 2,4-D o sometiénolas a congelación; ya que las semillas colocadas en tales ambientes absorben agua y comienzan el proceso de germinación desarrollando antagonismo y resistencia ante los hongos (Besnier, 1989).

### **Ensayos en agar.**

Estos no son tan utilizados como los anteriores, en parte por las mayores complicaciones que comportan. Para los hongos se utilizan tipos de agar con pH bajo siendo preferible utilizar agar ya preparado para su uso inmediato. Se deben desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio (Dhingra y Sinclair, 1995).

## Ensayos con congelación.

En este tipo de ensayos se matan por congelación las semillas, una vez iniciada la germinación; así, las semillas constituyen un sustrato nutritivo que favorece un profuso crecimiento de diversos hongos. Se utilizan papel filtro o placas de plástico, se colocan las semillas sobre estos materiales. En cereales se incuban durante 3 días a 10° C para iniciar la germinación y luego se incuban otros 2-4 días a 20°C, a continuación se someten a congelación a 20°C bajo cero durante una noche y luego se colocan de nuevo a 20°C bajo ultravioleta próxima (NUV) durante 5-7 días (Besnier, 1989).

Clasificación taxonómica de los hongos detectados en las semillas, según Alexopoulos, *et al.*,(1996).

Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Fungi						
	Acomycota					
		Deuteromycetes				
			Erotiales	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
					<i>Penicillium</i>	<i>fuscum</i>
		Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Rhizopus</i>	<i>stolonifer</i>

## Bacterias Transmitidas por Semillas

Muchas bacterias fitopatógenas son diseminadas por semillas infectadas interna o externamente y por material vegetativo como tubérculos, bulbos, raíces tuberosas, rizomas, estacas, y plántulas. Las enfermedades transmitidas por la semilla se caracterizan por dispersarse a grandes distancias, frecuentemente de Continente a Continente. Bajo condiciones ambientales favorables las enfermedades pueden ser fácilmente dispersadas de las plantas enfermas derivadas de un pequeño número de semillas infectadas, y

transmitirse a plantas sanas adyacentes, resultando finalmente una epidemia (Masao, 1992).

Las bacterias son comúnmente llevadas en las semillas; potencialmente un patógeno bacterial en plantas probablemente puede ser transmitido por semilla. Las bacterias con frecuencia son llevadas en la superficie de la semilla pero causan infecciones vasculares o sistémicas, frecuentemente la bacteria se establece en la cubierta de la semilla o en otros tejidos de la misma. La bacteria en la superficie de la semilla puede mantenerse activa solamente por un período limitado de tiempo, tal vez uno o dos años, sin embargo las bacterias que se encuentran dentro de los tejidos pueden extender su longevidad (Neergaard, 1979).

Actualmente, solo se han detectado seis géneros de bacterias que pueden ser transmitidas por las semillas; *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, y *Xanthomonas* (Besnier, 1989).

### **Daños Causados a las Semillas por Bacterias**

Los daños que ocasionan las bacterias en las semillas pueden ser de cuatro tipos:

- 1) Aborto de la semilla
- 2) Pudrición de la semilla
- 3) Decoloración de la semilla
- 4) Exudados o secreciones viscosas en la semilla

De acuerdo al patógeno y las condiciones durante la maduración de la semilla uno u otro de éstos daños puede ser común en la semilla o pueden presentarse combinaciones de daño (Neergaard, 1979).

Con pocas excepciones, la detección de bacterias en semillas es difícil, porque el número de semillas infectadas en un lote es abajo del 0.1% , el número de células patogénicas es bajo y un gran número de bacterias saprófitas interfieren en el crecimiento y detección de bacterias patogénicas en los medios selectivos o semiselectivos (Dhingra y Sinclair, 1995).

## **Métodos de Detección e Identificación de Bacterias**

### **Observación visual de semillas secas**

Las semillas secas se observan con la ayuda del microscopio de disección, puede indicarse la presencia de infecciones bacterianas, aunque las semillas con menores síntomas no sean detectadas y éstas pueden llevar bacterias (Agarwal y Sinclair, 1987, II).

### **Aislamiento en medio de agar**

Las semillas se colocan en un medio de agar y las colonias del patógeno son aisladas. Una ventaja de éste método es que el patógeno queda disponible para las siguientes pruebas. La desventaja que no todas las muestras crecen sobre un medio y algunos lotes tienen saprófitos que interfieren con la recuperación del patógeno (Randhawa, 1995)

La mayoría de las bacterias que afectan a las plantas se pueden identificar fácilmente al nivel de género, pero las especies o patovares son más difíciles de determinar. Actualmente existen métodos sofisticados para la identificación, que incluyen la determinación de la composición y homología del DNA, el análisis de los lípidos de la pared celular, y la Taxonomía Numérica, los cuales no se pueden realizar en todos laboratorios, por tal razón se debe recurrir a otras pruebas más sencillas como son las características culturales, fisiológicas o bioquímicas y serológicas (Rodríguez, 1994).

**Características culturales.-** Determinan los requerimientos nutricionales, así como las condiciones físicas del medio que favorecen el desarrollo de una bacteria en particular (Rodríguez, 1994).

**Características fisiológicas y bioquímicas.-** Se determinan cuando la bacteria a identificar, se hace crecer en la presencia de una sustancia nutritiva específica y después de cierto tiempo, el cultivo se examina para determinar los cambios químicos

que se llevaron a cabo, sin embargo no son enteramente satisfactorias ya que son complicadas y en algunas ocasiones difíciles de interpretar y requieren semanas o meses para completarse (Rodríguez, 1994).

**Cultivo de plantas y plántulas.-** Consiste en promover la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas en ambientes propicios para la aparición de los síntomas de la infección, detectando las plantas infectadas en razón de estos síntomas característicos, confirmando la infección aislando el exudado bacteriano a partir de las lesiones y cultivando la bacteria en medios selectivos, lo que permite confirmar la identificación por inoculación del cultivo puro a plantas sensibles o mediante reacciones serológicas (Besnier, 1989).

**Medios nutritivos.-** La identificación de las bacterias presentes en las semillas puede hacerse inoculando placas de agar con medios nutritivos específicos para las bacterias buscadas. La inoculación puede hacerse con extractos de semillas enteras desinfectadas superficialmente o con líquidos de lavados de las semillas (Besnier, 1989).

**Métodos serológicos.-** Con los cuales se pone de manifiesto la reacción entre antígeno y anticuerpo, y las fundamentales son:

**La aglutinación.** Es el resultado de la reacción entre el suero inmune específico y la bacteria completa por identificar.

**La precipitación.** Cuando el suero inmune se mezcla con un antígeno soluble.

Existen otras pruebas como la doble precipitación en gel, inmunofluorescencia, ELISA, las cuales se basan en la reacción de precipitación (Rodríguez, 1994).

**Técnica del Bacteriofago.-** Es similar a la prueba serológica en que se utiliza una reacción específica entre dos organismos que posiblemente identifican a los posibles causantes de la enfermedad. Las bacterias pueden ser identificadas por el uso de un fago (virus) especial, el cual se adiciona para homogenizar el material de las semillas

en el agar. Si la bacteria esta presente, una placa aparecerá sobre el agar por el ataque de la bacteria por el fago (Copeland y McDonald, 1985).

La principal desventaja de la técnica del fago es la especificidad. Muchos fagos infectan diferentes bacterias y algunos filtrados del patógeno pueden no ser susceptibles al fago (Saettler, *et al.* 1989).

La clasificación de bacterias es basada en morfología y fisiología, y especialmente en características bioquímicas.

La siguiente clasificación taxonómica de las bacterias detectadas es de acuerdo a Masao Goto (1992).

Reino	División	Clase	Familia	Género	Especie
Procaryonte					
	Gracilicutes				
		Proteobacteria			
			Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefasciens</i>
			Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	<i>spp</i>

## **Germinación**

Se define como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión, y que son manifestaciones de la habilidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables en el suelo. (Moreno, 1976).

La Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA, 1978), describe la germinación como la emergencia y desarrollo de aquéllas estructuras esenciales del embrión de la semilla, que para la clase de semilla en cuestión son indicativos de la habilidad de producir una plántula normal bajo condiciones favorables, llámesele viabilidad o capacidad de germinación (ISTA, 1985).

En las pruebas de laboratorio se considera a la germinación, como la emergencia y desarrollo de las estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta sana y establecerse en condiciones favorables (Camacho, 1994).

La germinación de semillas forestales en el vivero y en el campo generalmente es del 50 al 80% de la germinación de laboratorio (en el trópico puede llegar al 95%) pero después de la germinación todavía puede ocurrir pérdidas. Por lo mismo el número de plántulas aprovechables producidas por 100 semillas viables regularmente va de 10 a 60 para coníferas y varía aún más en especies de hoja ancha. El promedio para Piceas es de 31 a 40, y 61 a 80 para la mayoría de los pinos. (Rudolf, 1984).

### **Usos de las Pruebas de Germinación y de Vigor de la Semilla**

Las pruebas de germinación tienen como objetivo, obtener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales; además permiten hacer comparaciones del poder germinativo entre diferentes lotes de semillas de la misma especie (Moreno, 1984).

Las pruebas de germinación están diseñadas para indicar tan cercanamente como sea posible, a formar plantas fuertes en el campo, el jardín y el bosque. Las pruebas de germinación son de gran importancia ya que con éstas se ahorra pérdida de tiempo y dinero. (Vera *et al.*, 1984).

Las pruebas de la germinación y vigor de la semilla según Warham *et al.*,(S/A), pueden utilizarse para lo siguiente:

- En programas de control de calidad
- Como indicadores de la vida útil en el almacenamiento
- Para evaluar los efectos de los tratamientos de semilla y otras operaciones importantes
- Para prevenir posibles problemas
- Para identificar lotes de semilla de buena calidad

- Para satisfacer las demandas del consumidor
- Para etiquetar las semillas

### **Pruebas de Germinación**

Las pruebas de germinación están diseñadas para indicar tan cercanamente como es posible, desarrolle a formar plantas fuertes en el campo, el jardín y el bosque. Las pruebas de germinación son de gran importancia ya que con éstas se ahorra pérdida de tiempo y dinero. (Vera *et al.*, 1984).

Los ensayos de germinación en laboratorio tienen por objeto determinar la capacidad de una muestra de semillas para producir plántulas normales.

Vigor intrínseco.- (se aprecia en el laboratorio). Es la capacidad de las semillas para producir, rápida y uniformemente, plántulas normales en condiciones específicas de laboratorio. Esta capacidad depende, fundamentalmente, de tres condicionantes principales; estado de la maquinaria bioquímica, amplitud de las reservas nutritivas y constitución genética.

Vigor extrínseco.- (ó vigor de las plántulas que necesariamente ha de apreciarse en condiciones de campo). Se define como la capacidad de las semillas para producir plántulas normales de cultivo. Esto implica establecer para cada especie y región climática, que es lo que hay que considerar como “condiciones normales del cultivo”, y además, cuáles son las condiciones anormales en las que el vigor del lote de semillas tiene la más decisiva importancia. (Besnier,1989)

Para las pruebas de germinación se recomiendan 400 semillas tomadas al azar de una muestra de semilla pura homogenizada. Se puede utilizar diferentes tipos de sustratos como son: papel secante, papel filtro, papel kimpak, toallas de papel, tela, algodón, arena y tierra (Moreno, 1984; Copeland y Mc Donald, 1985).

Un medio ideal para que las semillas puedan germinar y se pueda observar el crecimiento inicial de las plántulas, debe tener una buena retención de humedad, pH entre 6 y 7.5, porosidad y ausencia de sustancias tóxicas y microorganismos que puedan afectar la germinación de las semillas (Camacho, 1994).

Moreno (1984), menciona que al hacer pruebas de germinación en papel, las semillas se colocan encima de una o más capas de papel, se colocan en cajas petri, cajas de plástico o en charolas de las germinadoras; también se pueden colocar las semillas entre hojas de papel, ya sea en las charolas de germinadoras o dentro de cajas petri u otro tipo de cajas de plástico, metal o vidrio. El papel puede quedar enrollado como el caso de las “muñecas” (tacos), que se pueden colocar en posición vertical, horizontal o inclinada.

El mismo autor menciona que para la evaluación de las plántulas usualmente se efectúan dos conteos; en el primer conteo se eliminan y registran las plántulas normales y semillas muertas invadidas por hongos, en el segundo conteo se hará el registro total, considerando plántulas normales, plántulas anormales, semillas latentes y semillas muertas.

La evaluación de las pruebas de germinación Copeland y McDonald (1985), clasifican a éstas en plántulas normales, plántulas anormales, semillas en dormancia y semillas muertas.

### **Plántulas normales:**

Una plántula normal es definida por las Reglas Internacionales de Pruebas de Semillas (1979), como aquélla que demuestra la capacidad para continuar su desarrollo en una planta normal con suelo de buena calidad bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Esta capacidad para continuar su desarrollo depende de la solidez y capacidad para continuar el desarrollo de sus estructuras durante la germinación.

Tres categorías de plántulas se clasifican como normales:

- Plántulas intactas: plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas, proporcionadas y sanas. Buen desarrollo del sistema radicular, tallo y un número específico de cotiledones (1 cotiledón en monocotiledóneas, 2 en dicotiledóneas y de 2 a 18 en coníferas), hojas primarias verdes expandiéndose, el desarrollo del ápice varía de acuerdo a la especie (ISTA, 1979).
- Plántulas con defectos leves: plántulas que muestran ciertos defectos leves en sus estructuras esenciales, siempre que en los demás aspectos el desarrollo sea satisfactorio y equilibrado, comparable al de las plántulas intactas de la misma prueba (Warham, *et al.*, S/A).
- Plántulas con infección secundaria: plántulas que podrían ir incluidas en una de las categorías anteriores, pero que han sido afectadas por hongos o bacterias provenientes de fuentes distintas de la semilla progenitora. (Warham *et al.*, S/ A).

**Plántulas anormales:**

- a) Una plántula anormal es definida como aquélla la cual no tiene la capacidad de desarrollarse en una planta normal cuando se siembra bajo condiciones favorables, porque una o más de sus estructuras esenciales han sido dañadas irreparablemente (ISTA, 1979).

La Asociación Oficial of Seed Analysts (1992) clasifica como una plántula anormal cuando presenta una de las siguientes características:

- Una o más estructuras esenciales deterioradas como resultado de infección primaria (ésta puede resultar por el ataque de hongos o bacterias, a menudo como una consecuencia de daños externos o debilidad interna, una excepción es hecha por infecciones secundarias).
- Embriones fusionados
- Débiles o quebradas
- Acuosas, apariencia traslúcida
- Albinas
- b) Plántulas que no muestran el potencial de desarrollarse para convertirse en una planta normal cuando se les cultiva en suelos de buena calidad y en condiciones

favorables de humedad, temperatura y luz (Warham *et al.*, S/A) y clasifica como anormales las siguientes plántulas:

- Plántulas dañadas: plántulas en las que falta alguna de las estructuras esenciales o alguna de esas estructuras está dañada irreparablemente o en grado tal que no se puede esperar un desarrollo equilibrado.
- Plántulas deformes o desequilibradas: plántulas con un desarrollo débil o una perturbación fisiológica, o en las cuales las estructuras esenciales están deformadas o son desproporcionadas.
- Plántulas podridas: plántulas en las que alguna de las estructuras esenciales está tan enferma o podrida como resultado de una infección primaria (es decir, originada en la semilla progenitora) que no es posible un desarrollo normal.

Semillas duras.- Son aquéllas semillas que permanecen duras al final de la prueba de germinación, ya que no absorben agua debido a que tienen cubierta impermeable (Moreno, 1976 y Besnier, 1989).

Semillas latentes y frescas o firmes.- Se denominan semillas latentes a las semillas viables (diferentes a las semillas duras) que no germinan aún cuando estén bajo las condiciones que se especifican para dicha especie, aunque hayan embebido agua y aplicado el tratamiento correspondiente, ni tienen signos evidentes de descomposición (Moreno, 1976 y Camacho, 1994).

### **Análisis de Pureza**

Tiene como objeto determinar la composición porcentual en peso, de la muestra de análisis; ésta se separa en tres componentes: semillas puras, otras semillas, y materia inerte, para la separación de éstas se pueden utilizar, como medios auxiliares, cribas

sopladores, lupas, estereoscopio; en el caso de usar sopladores y cribas, las fracciones deben volver a examinarse a mano (Besnier, 1989).

Esta práctica debe realizarse para determinar la composición de un lote de semillas separando las semillas de los materiales que traen consigo (García y Flores, 1993)

Patiño, (1973), cita que la separación de las semillas vanas o vacías, se efectúa por corrientes de aire, lo cual permite obtener lotes de semillas con pureza de 94 a 95%.

### **Calidad de la Semilla**

Una semilla es buena cuando tiene la facultad germinativa, es decir, el poder de germinar si se coloca en condiciones convenientes. Las semillas pierden esta facultad con la edad y más rápidamente cuando su conservación es defectuosa (Cuisance, 1988).

La semilla de buena calidad presenta las siguientes características, de acuerdo con Hartman y Kester (1999)

- Reproduce con fidelidad las características genéricas de la especie a cultivar
- Tiene capacidad para una germinación elevada
- Esta libre de enfermedades e insectos

Patiño, *et al* (1983), mencionan que los factores que afectan la calidad de la semilla son:

- Madurez de la semilla
- Viabilidad inicial
- Naturaleza de la testa
- Método de procesamiento y almacenamiento de semilla

Los factores que influyen sobre la calidad de la semilla en especies forestales según Wang y Beardmore (2000) son:

- Recolección de conos (época de recolección, humedad del cono, madurez)

- Manejo de conos (Temperatura ambiental, recolección)
- Procesamiento de la semilla (secado en estufa, desalado, acondicionamiento)
- Almacenamiento de la semilla (Humedad de la semilla, temperatura de almacenamiento, tipo de envase).

Cuadro 1. Efecto del contenido de humedad sobre la viabilidad y plagas de semillas almacenadas, tomado de Camacho (1994).

Contenido de Humedad	Daño Potencial
Menor de 5%	En algunas tolerantes al secado, pérdida de viabilidad por auto-oxidación líquida.
De 5 a 10%	Ideal para una longevidad prolongada en las tolerantes al secado.
Mayor de 10%	En semillas con actividad metabólica, tolerantes al secado, se reduce la viabilidad, más susceptibles al ataque de insectos y de hongos, con temperaturas mayor de 0°C.
Mayor de 18%	Se facilita el ataque de hongos, daños por calentamiento debido a una respiración activa de la semilla, puede haber daños por temperaturas inferiores a las de congelamiento
Entre 20 y 30%	Es posible mantener la viabilidad de semillas no tolerantes al secado, con contenidos menores al límite inferior estas semillas mueren.
Mayor de 30%	Ocurre la germinación, si las semillas no son durmientes, o si la temperatura lo permite, es prácticamente inevitable la muerte por congelamiento.

## **Viabilidad**

La viabilidad es la cualidad de una semilla de ser potencialmente capaz de germinar. Esta cualidad se ve influida por factores que actúan antes y después de la maduración de las semillas (Hartmann y Kester, 1999), se puede expresar como el porcentaje de germinación, que indica el número de plantas por un número dado de semillas.

La pérdida de la viabilidad en las semillas puede resultar por causas externas, como el ataque de hongos, insectos o roedores. El calor excesivo, las heladas, la sequía, la salinidad y las carencias nutricionales que ocurran antes de la maduración de las semillas (Camacho, 1994).

Según Niembro (1980), las semillas se dividen en tres clases, de acuerdo con su lapso de vida bajo las mejores condiciones posibles, éstas se clasifican en:

Microbióticas, cuya viabilidad de manera natural generalmente no se prolonga por más de 3 años.

Mesobióticas, aquí se incluyen todas aquellas semillas las cuales llegan a permanecer viables por espacio de 3 a 15 años. Los más comunes que se tienen en la mayoría de las especies de *Pinus*, *Abies*, *Cupressus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, etc. así como algunas latifoliadas como *Fraxinus* y *Liquidambar*.

Macrobióticas.- Estas permanecen viables por espacio de muchos años.

La mayoría de plantas silvestres de la zona templada se conservan mejor si son desecadas completa y cuidadosamente, colocadas en recipientes perfectamente cerrados y almacenadas con refrigeración moderada. Las semillas, de plantas enfermas o de otras poco vigorosas, generalmente tienen menos longevidad que la mayoría de las plantas normales. Deben conocerse específicamente métodos adecuados para almacenamiento y métodos también adecuados para la germinación, antes de que el máximo de la longevidad de la semilla pueda conseguirse. ( Quick, 1984).

Camacho (1994) cita que la mayoría de las semillas forestales son ortodoxas, son liberadas por la planta madre con contenidos de humedad menores al 20% y tolerar el

secado hasta un 5% sin que mueran, la escasa cantidad de agua contenida les permite mantenerse en frío a temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta  $-190^{\circ}\text{C}$ , la duración del almacenamiento depende de las especies de que se trate.

### **Tratamientos Especiales Para Activar la Germinación**

Besnier (1989) menciona, que, las semillas de algunas especies tienen una germinación tardía ya sea debido a que su envoltura impermeable impida la fácil absorción del agua, o aún adormecimiento del embrión, el cual desaparece generalmente después de un período de descanso o post-maduración durante el cual se operan determinados cambios físicos y químicos que son necesarios para que la germinación se efectúe.

Comúnmente se presentan 4 casos en los que es preciso recurrir a tratamientos especiales para activar la germinación:

- a) Semillas que posean una envoltura impermeable que dificulte la absorción de la humedad y el intercambio de gases.
- b) Semillas que tengan un embrión adormecido.
- c) Semillas que tengan una combinación de envoltura impermeable y embrión adormecido, y
- d) Semillas cuyo embrión está imperfectamente desarrollado y necesita un tiempo adicional para desarrollarse completamente.

Las semillas cuya envoltura sea ligeramente impermeable, no necesitan otro tratamiento que sumergirlas en agua fría.

Las semillas que tengan su embrión adormecido necesitan un período de reposo cuya duración es variable con las especies y lo mejor es estratificarlas.

**Escarificación.-** Consiste en romper la testa a fin de facilitar el paso de agua y los gases al endospermo de la semilla, el proceso se realiza introduciendo las semillas en un recipiente con arena u otro material abrasivo o con aristas que permitan rasgar la testa. Si las semillas son demasiado duras, también se pueden tallar las semillas con una lija o lima (Camacho, 1994; García y Flores, 1993).

**Estratificación.-** Consiste en colocar las semillas en capas o estratos húmedos a temperaturas altas (14-20°C) o bajas (0 a 4°C), usando un substrato que puede ser arena de río, aserrín, vermiculita o musgo. El tiempo que deben estratificarse las semillas varía según la especie; en general para pinos se emplean de 2-4 semanas antes de colocarse en el medio germinativo (García y Flores, 1993; Hartmann y Kester, 1999).

**Inmersión en agua fría o caliente.-** Como todas las semillas necesitan absorber agua para que germinen, el período de germinación puede acortarse sumergiéndolas en agua fría, lo que da buenos resultados ya sea que tengan su embrión adormecido o hayan sufrido una desecación excesiva. El remojo facilita y activa la germinación, su duración, es de 12 a 24 horas normalmente, no excede de 3 días (Besnier, 1989 y Cuisance, 1988).

**Presecado.-** Las semillas son colocadas a una temperatura que no exceda los 40° C (35-40° C), bajo continua circulación de aire, durante un periodo hasta de 7 días. Después de secarlas se someten a la prueba normal de germinación. En ocasiones es necesario prolongar el período de secado (Moreno, 1984).

**Substancias químicas.-** Para eliminar algunos inhibidores presentes en las cubiertas de las semillas y también para adelgazar la cubierta se han empleado sustancias químicas entre las que se encuentran los ácidos sulfúrico, nítrico o clorhídrico. También se emplea agua oxigenada, alcohol y acetona. En el caso de emplear cualquier sustancia química, posteriormente al tratamiento, las semillas se deben enjuagar con agua corriente para eliminar residuos de las sustancias (Camacho, 1994; García y Flores, 1993).

Letargo o reposo: Es una fase de la vida de la semilla, después de la maduración, en la cual su desarrollo se encuentra detenido por factores estructurales o fisiológicos, dependientes de la propia semilla, el cual el desarrollo, se encuentra detenido por la inexistencia de factores ambientales favorables a la germinación (Besnier, 1989).

La nacencia de las plantas puede verse seriamente perturbada por la acción de microorganismos y, más raramente, por animales. La mayoría de estos microorganismos

son hongos; en caso de enfermedades bacterianas de las plantas, si la infección alcanza a las semillas, como sucede con la grasa de las judías, las semillas atacadas germinan mal y si lo hacen, las plántulas infectadas suelen ser débiles. Los hongos pueden infectar las semillas durante su formación y maduración, en su almacenamiento o bien tras la siembra (Besnier, 1989).

### **Factores que influyen en la Germinación**

#### **Factores internos.**

Dormancia.- Es el resultado de la interacción de las condiciones ambientales impuestas y las propiedades hereditarias de las plantas; a demás de que puede deberse al bloqueo de la inhibición de agua, la activación de los procesos metabólicos y el crecimiento del embrión (Krugman *et al.*, 1974)

Viabilidad.- Esta cualidad se ve influida por factores que actúan antes y después de la maduración de las semillas (Hartmann y Kester, 1999).

#### **Factores ambientales.**

Según Hartmann y Kester (1999) los factores ambientales que influyen en la germinación son:

Agua.- El contenido de agua es un factor muy importante en el control de la germinación de la semilla. Con menos del 40 o 60% de agua en la semilla (con base en peso fresco), no se efectúa la germinación. El mantenimiento de una provisión de humedad adecuada y continua a las semillas puede resultar difícil ya que la germinación se efectúa en la capa superior del medio de germinación, que esta expuesta a fluctuaciones de humedad y pérdidas rápidas de la misma.

Temperatura.- La temperatura es el factor ambiental más importante que regula la germinación y controla el crecimiento subsecuente de las plántulas.

Aereación.- Un buen intercambio de gases entre el medio de germinación y el embrión es básico para una germinación rápida y uniforme. El Oxígeno es esencial para el proceso de respiración de las semillas en germinación.

Luz.- La luz puede afectar la germinación de las semillas de ciertas especies. En algunos casos, los requerimientos de luz están asociados también con requerimientos de temperaturas diurnas.

### **Pruebas de Patogenicidad**

Copeland y McDonald, (1985) citan que las pruebas de patogenicidad consisten en realizar aislamientos de los patógenos sospechados, sembrando éstos en agar para la identificación, inoculando a plantas sanas (generalmente se utilizan plántulas), para la observación de los síntomas del patógeno, posteriormente reaislarlo y sembrarlo. Este procedimiento sigue los postulados de Koch, es un método de identificación positiva de varios patógenos, la inoculación puede ser por inyección, aspersion y espolvoreación.

Estas pruebas son esenciales para observar muchos patógenos bacteriales de plantas que algunas veces desarrollaran una reacción de enfermedad en muchos que no son hospederos si la población de la bacteria es alta, por ejemplo  $10^7$  células/ml o si las condiciones ambientales son adversas al crecimiento de la planta. Las pruebas en el hospedero confirman la identidad de un patógeno sospechado (Lelliott y Stead, 1987)

### **Pruebas rápidas de patogenicidad**

El demostrar la patogenicidad de una cepa bacteriana es un procedimiento complicado que requiere mucho tiempo para que aparezcan los síntomas típicos de la enfermedad en la planta y no siempre se dispone de este material, siendo aún más difícil cuando se trata de árboles. Debido a estos problemas, se ha investigado la forma de determinar en un corto tiempo la patogenicidad de aislamiento bacteriano, a la fecha se tiene la reacción de hipersensibilidad, pudrición de papa, inoculación a frutos verdes de peral o manzana (Rodríguez, 1994).

Para que las reacciones anteriores se presenten, se deben utilizar los frutos o verduras sensibles a la bacteria de la cual se sospecha; por ejemplo para realizar pruebas para *Agrobacterium spp* se puede utilizar zanahoria, remolacha, nabo y chirivía (Lelliott y Stead, 1987).

## MATERIALES Y METODOS.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Para esto se utilizaron muestras de semilla de tres especies de coníferas de lotes de diferentes años de colecta, colectadas en la Sierra La Marta, propiedad privada, Municipio de Rayones, Nuevo León. Las muestras fueron las siguientes (ver Cuadro 2). Proporcionadas por el Ingeniero Sergio Braham Sabag, encargado del invernadero de alta tecnología de la UAAAN.

Cuadro 2. Muestras de semillas de tres especies de coníferas (*Abies vejari*, *Pinus culminicola* y *Picea engelmannii* var. *mexicana*).

Muestra	Especie	Año de Colecta	Lugar de Colecta
M1	<i>Picea engelmannii</i> var. <i>mexicana</i>	1995	Sierra La Marta
M2	<i>Abies vejari</i>	1998	Sierra La Marta
M3	<i>Pinus culminicola</i>	1998	Sierra La Marta
M4	<i>Picea engelmannii</i> var. <i>mexicana</i>	1999	Sierra La Marta
M5	<i>Abies vejari</i>	1999	Sierra La Marta
M6	<i>Picea engelmannii</i> var. <i>mexicana</i>	1981	Sierra La Marta

### Detección de hongos

Las muestras 1, 2 y 3 fueron examinadas por el método del papel secante (Copeland y McDonald, 1985). El procedimiento consistió en seleccionar 25 semillas al azar, las cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 3 minutos; antes de colocarlas en las cajas petri con 2 láminas de papel filtro humedecidas con agua destilada estéril. Se colocaron 5 semillas en cada caja en forma equidistante y bien distribuidas, para evitar el contacto de una con otra, después se sellaron con kleen pack y

se metieron a la incubadora a una temperatura de 28° C, por un periodo normal de 5 a 7 días, tiempo suficiente para que los hongos se desarrollen y formen estructuras que faciliten su identificación.

La evaluación se hizo con la ayuda de un microscopio estereoscópico, cuantificando los hongos de acuerdo al color y tipo de estructuras que presentaron, así como cuantificando el número de semillas infectadas en cada muestra.

De cada crecimiento fungal diferente que se presentó se realizaron montas semipermanentes en lactofenol, se observaron en el microscopio compuesto y con la ayuda de claves de Barnett y Hunter (1986) y Pitt y Hocking (1985), llegar a la identificación de cada uno de los hongos. La identificación de especies se realizó con la ayuda del micrómetro, midiendo las estructuras de los hongos y por medios específicos para el crecimiento de algunas especies, como es el caso de *Aspergillus flavus* que crece y esporula en el medio Czapek según Raper y Fennell (1965) citado por Moreno (1988).

### **Detección de Bacterias**

En este caso las mismas muestras se examinaron por los métodos de papel secante y medios de agar, para después pasar a los medios selectivos, además de las pruebas bioquímicas.

#### a) Detección de bacterias por medio de papel secante.

Al igual que en la detección de hongos se seleccionaron 25 semillas al azar de cada muestra, las cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 3 minutos, en el caso de la muestra 3, se le dio un lavado previo a la desinfección con agua destilada estéril para eliminar el fungicida con el que estaba tratada, enseguida se le quitó la testa; después se colocaron en cajas petri con 2 láminas de papel filtro humedecidas con agua destilada estéril. Se colocaron 5 semillas en cada caja en forma equidistante y bien distribuidas para evitar el contacto de una con otra, después se sellaron con kleen pack y se incubaron a una temperatura de 28° C por 5 a 7 días, para esperar a que aparecieran las

bacterias. Pasado ese tiempo se aislaron y purificaron todos los tipos de colonias que se encontraron en agar nutritivo, se incubaron por 24 horas, posteriormente se realizó la tinción de gram para observar el tamaño, forma y color de las bacterias y determinar si eran fitopatógenas; después se pasaron a los medios selectivos y por medio de estos hacer la identificación. Los medios que se utilizaron fueron KB, YDC, D1M, D3K, y CVP.

b) Detección de bacterias por medios de agar.

Se realizó lo mismo que en el método del papel secante, la diferencia es que las semillas se colocaron en cajas petri con agar nutritivo, 5 semillas por caja, se sellaron con kleen pack y se llevaron a incubación a una temperatura de 28° C por 5 días, para esperar a que aparecieran las bacterias. Pasado ese tiempo se aislaron y purificaron todos los tipos de colonias que se encontraron en Agar nutritivo donde se incubaron por 24 horas y realizar la tinción de gram y después pasarlas a los medios selectivos y por medio de estos hacer la identificación de géneros. Los medios que se utilizaron fueron YDC, KB, D1M, D3K y CVP.

### **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas se realizaron para determinar la especie, pero solamente en *Agrobacterium*, de acuerdo a Schaad (1994). Las pruebas son las siguientes:

- Oxidación-fermentación

Medio Hugh y Leifson

Peptona ----- 2.0 g.

NaCl ----- 5.0 g.

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ----- 0.3 g.

Azul de Bromotymol ----- 3.0 ml.(Solución acuosa al 1%)

Agua destilada ----- 1000 ml.

Se disuelven los ingredientes y se ajusta el pH a 7.1. Se esteriliza, se agrega solución de glucosa al 10% por filtración. Posteriormente se dispensa en tubos de ensaye de 13x100 estériles. Se inoculan 2 tubos por cada cepa a estudiar, uno se sella con 0.5 ml. de aceite

mineral estéril para crear condiciones de anaerobiosis y el otro tubo sin aceite. El cambio de color de verde a amarillo indica que la prueba es positiva.

- Crecimiento en NaCl al 2%

Medio NGA (Agar Nutritivo Glucosa)

Extracto de carne ----- 3 g.  
Peptona ----- 5 g.  
Glucosa ----- 2.5 g.  
Agar ----- 15 g.  
Agua destilada ----- 1000 ml.

Se inoculan tubos con medio NGA inclinado conteniendo cloruro de sodio al 2% y se observa su crecimiento.

- Crecimiento a 35°C

Se inoculan tubos con el medio NGA y se incuban hasta por 10 días a 35°C. Se observa su crecimiento.

- Acidos de: Sucrosa, Erytritol, Melezitosa

Medio para producción de ácido.

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 1.0 g.  
Kcl ----- 0.2 g.  
MgS<sub>04</sub>.7H<sub>2</sub>O ----- 0.2 g.  
Extracto de levadura ----- 1.0 g.  
Azul de Bromotimol ----- 3.0 ml  
Agar ----- 1.5 g.  
Agua destilada ----- 1000 ml.

Se disuelven todos los componentes en el agua destilada a excepción del agar que se añadirá después de haber ajustado el pH a 7.1 con NaOH. Después de esterilizarlo se agregan los diferentes carbohidratos esterilizando por filtración de tal modo que la concentración del carbohidrato en el medio sea del 1%. Se dispensa el medio asépticamente en tubo de ensaye con tapa de rosca estéril, en una cantidad de 4 ml. Se

inoculan los tubos y después de 48 a 72 horas, el desarrollo de un color amarillo en el medio indica la producción de ácido de la oxidación del erytritol, melezitosa o sucrosa.

- Oxidasa

Para la prueba se utilizan cultivos de 24 horas de crecimiento. Se toma un poco de crecimiento bacteriano con un palillo de dientes y se deposita en papel filtro impregnado con solución de Tetramethyl-p-phenylenediamina dihydrochloride al 1%. Cuando se desarrolla un color azul púrpura después de 10 segundos y antes de 30 segundos la prueba es positiva.

Si no se desarrolla ninguna coloración la prueba es negativa.

- Catalasa

En un portaobjetos se coloca una gota de agua oxigenada, con una asa bacteriana se toma crecimiento bacteriano y se disuelve en la gota, si se observan burbujas la reacción es positiva.

- Citrato de Amonio Férrico

Citrato de amonio férrico ----- 10 g.  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ----- 0.5 g.  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 0.5 g.  
CaCl<sub>2</sub> ----- 0.2 g  
Agua destilada ----- 1000 ml.

Se ajusta el pH a 7 antes de esterilizar se inoculan los tubos y se incuban en posición estacionaria. Si se produce una coloración café rojiza, la prueba es positiva

- Utilización de Citrato

Agar Citrato de Sodio

NaCl ----- 5g.  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ----- 0.2 g.  
NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 1.0 g.  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 1.0 g.

Citrato de Sodio ----- 2.0 g.  
Agar ----- 20 g.  
Azul de Bromotimol ----- 15 g. (Solución al 1% en etanol)

Se prepara el medio y se ajusta el pH a 6.8, se agrega el agar y se distribuye en un tubo de ensaye, se esteriliza y se deja solidificar inclinado. Se inocula con la bacteria y después de 24 a 48 horas. Si el medio adquiere un color azul prussiano oscuro es que el citrato ha sido utilizado y la prueba es positiva.

- Prueba de hipersensibilidad en tabaco

Se prepara una dilución con agua destilada estéril y crecimiento bacteriano en un tubo de ensaye con tapa de rosca estéril se agita en un agitador eléctrico hasta que la bacteria se haya disuelto bien. Se toma la dilución con una jeringa de insulina y se inocula la planta de tabaco. La reacción se observa a las 24 horas, si la planta se marchita, la prueba es positiva.

### **Pruebas de Patogenicidad**

La investigación de la patogenicidad se realizó solamente para bacterias, ya que los hongos encontrados son de almacén.

Para bacterias se realizó el estudio de patogenicidad para *Agrobacterium sp*, ya que está reportada afectando a especies forestales. La inoculación se hizo en rodajas de zanahoria (Lelliott y Stead, 1987) ya que no hubo plantas de las especies estudiadas. Esta prueba también se realizó para *Erwinia* ya que esta bacteria también se presentó en las muestras de semillas, la inoculación se hizo en rodajas de papa (Schaad, 1994).

En la cámara de transferencia se realizaron disoluciones 10:0 de crecimiento bacteriano, de cada uno de los géneros a probar, en tubos con agua destilada estéril. Se flameó un tubérculo de papa y una zanahoria para desinfectar superficialmente, para esto se les asperjó etanol al 70 %, previo a esto se lavaron y secaron. De estas verduras se cortan rebanadas aproximadamente de 5mm de grosor y se colocan en cajas petri con papel filtro

estéril. A cada una de las rebanadas se les hace una incisión superficial y a cada una de ellas se le pone 0.1 ml de la dilución de la bacteria a probar. Finalmente se le adicionan unos 2-3 ml de agua destilada estéril para humedecer el papel y crear un ambiente húmedo, se incuban a 28°C durante 24-72 horas. A partir de las primeras 24 horas se palpa el tejido de cada una de las rebanadas de papa y si se siente blanda indica que la bacteria probada sintetiza enzimas pectolíticas y es muy probable que sea el agente causal de la pudrición; en las rodajas de zanahoria se debe observar una agalla en el lugar donde se inoculó con la bacteria o crecimiento de raíces adventicias, el desarrollo de éstos síntomas se observa alrededor de 3 a 4 semanas. La inoculación en papa es para *Erwinia* y en zanahoria para *Agrobacterium*.

Los síntomas aparecieron de 3 a 4 semanas en zanahoria y en papa de 24- 72 horas (Schaad, 1994).

### **Análisis de pureza de la semilla**

Esta se realizó con el fin de tener lotes de semillas con un alto porcentaje de pureza, para impedir que semillas vanas o vacías fueran utilizadas en la prueba de germinación. La limpieza de las muestras 1,2, 4, 5 y 6 se llevó a cabo en el laboratorio de Tecnología de Semillas, utilizándose una sopladora de semillas, la cual separa las semillas vanas o vacías por corrientes de aire (Patiño, 1973).

La separación de semillas de la M3 se realizó por flotación con Acetato de Etilo, sugerida por Flores (1999).

### **Tratamiento para activar la germinación**

Se utilizó el método de remojo o inmersión en agua y el de estratificación (Besnier, 1989 y García y Flores, 1993). Se tomaron 100 semillas de cada una de las especies (M1, M2 y M3) al azar y se colocaron en un matraz con agua estéril durante 24 horas. Para la

M2 (*Abies*) también se utilizó la estratificación, se colocó la semilla en peat-moss estéril humedecido con agua estéril y se refrigeró a una temperatura de 4°C durante 21 días.

### **Pruebas de germinación**

Esta prueba se realizó con el objeto de conocer el efecto de los hongos y bacterias en la germinación de la semilla. La germinación se realizó por el método de entre papel secante, colocando la semilla sobre una lámina de papel germinador humedecido con agua destilada estéril con Captan (en un litro de agua se agregó 1gr de Captan), en cada lámina se colocaron 100 semillas (para *Pinus culminicola* se realizaron 2 tacos de 50 semillas cada uno) en forma equidistante y luego se le colocó otra lámina encima para después envolverla y formar tacos, los cuales previamente etiquetados se metieron en bolsas de polietileno, se llevaron a la cámara germinadora a una temperatura de 18 a 21° C. El riego se realizó cada vez que les faltaba humedad, con agua destilada estéril con Captan para evitar hongos contaminantes. Para hacer la evaluación se hicieron 4 conteos, a los 7, 14, 21 y 28 días, evaluando semillas germinadas, no germinadas, plántulas normales y plántulas anormales.

Después se realizó una segunda prueba de germinación, para comparar los resultados obtenidos de la primera prueba que era semilla almacenada con semilla recién colectada; solo se realizó para *Picea* y *Abies*, ya que semilla de *Pinus culminicola* no hubo. Para *Picea* se analizó un lote más que tenía 19 años almacenado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los patógenos encontrados en las 6 muestras de semillas de las 3 especies de coníferas que se analizaron se pueden ver en el cuadro (3) En el cual se observa un total de 5 agentes, los cuales corresponden a hongos y bacterias.

CUADRO 3. Número de semillas con incidencia de microorganismos detectados en las seis muestras de semillas de tres especies de coníferas (*Abies vejari*, *Pinus culminicola* y *Picea engelmannii* var. *mexicana*)

Microorganismos	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Hongos						
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	33	0	0	0
<i>Penicillium fuscum</i>	20	27	25	0	23	6
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0	5	4	0	0	0
Bacterias						
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40	36	49	0	0	0
<i>Erwinia sp</i>						

M1= *Picea engelmannii* var. *mexicana* 1995

M2= *Abies vejari* 1998

M3= *Pinus culminicola* 1998

M4= *Picea engelmannii* var. *mexicana* 1999

M5= *Abies vejari* 1999

M6= *Picea engelmannii* var. *mexicana* 1981

Se observa un mayor número de microorganismos en la muestra 3 la cual fue portadora de 5 agentes, la muestra 2 con 3 de ellos y la muestra 1 con 2; las cuales corresponden a semilla almacenada por 1,1 y 4 años respectivamente; mientras que con un menor número la muestra 5 y 6, y no presentó ningún microorganismo la muestra 4, éstas son semillas recién colectadas, excepto la muestra 6 que ha sido almacenada por 19 años.

CUADRO 4. Microorganismos endobióticos y epibióticos (Vázquez y Pineda, 1989) encontrados en seis muestras de tres especies de semillas forestales.

Endobióticos	Epibióticos
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Penicillium fuscum</i>	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
<i>Erwinia sp</i>	

La incidencia de *Aspergillus flavus* y *Penicillium fuscum*, se detectaron con mayor frecuencia y esto se debió a que la semilla no se almacenó adecuadamente, principalmente la muestra 3 que fue la que presentó los dos, además de *Rhizopus stolonifer*, el cual también es un hongo de almacén y contaminante. *Aspergillus* y *Penicillium* se desarrollan bajo condiciones inadecuadas de almacén, pero las esporas pueden venir en los conos y semillas del campo, al igual que las bacterias, esto concuerda con varios autores (Besnier, 1989; Horsfall, 1978; Neergard, 1979 y Moreno, 1980).

En lo que se refiere al número de semillas germinadas se puede observar en el cuadro 5. La germinación fue muy baja en las muestras 3, 4 y 6; y nula en las muestras 1, 2 y 5.

CUADRO 5. Evaluación de semillas germinadas, no germinadas, plántulas normales, y plántulas anormales.

Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Plántulas normales (Germinación)	0	0	21	20	0	37
Plántulas anormales	0	0	0	4	0	2
Semillas no germinadas						
Semillas duras	12	10	0	14	9	32
Semillas firmes o frescas	28	22	0	62	10	23
Semillas infectadas	60	68	79	0	23	6
Total	100	100	100	100	100	100

La germinación baja en la M3 (*Pinus culminicola*) se puede deber al gran número de patógenos endobióticos (ver cuadro 4), éstos afectan la germinación. Otra causa que pudo influir es el almacenamiento después de haber sometido la semilla a un remojo y secado al sol provocando sobrecalentamiento, ocasionando que la semilla perdiera vigor o muriera, ya que pueden calentarse a más de 50-60°C, a demás de que las condiciones de humedad y temperatura fueron adecuadas para el desarrollo de hongos. Las semillas que no germinaron, todas estuvieron infectadas (Vázquez y Pineda, 1989; Moreno y Zamora, 1978; Neergard, 1979; Braham, 1999 y Robins y Ochoa, 1983)

En las M4 y M6 (*Picea engelmannii* var. *mexicana*) la germinación baja, puede deberse a que el potencial de reproducción de ésta especie, así como el porcentaje de germinación es bajo, ocasionada por efecto de autopolinización de sus árboles, ocasionando que la calidad y cantidad de semillas producidas disminuya, aunándose a esto los cambios ambientales en los últimos años; otro factor importante pudo ser la dormancia, que no se haya interrumpido con el método empleado (remojo). A demás de que las semillas contaminadas con *Penicillium* no germinaron demostrando que éstos patógenos afectan la germinación. Las semillas que no germinaron, algunas se veían hinchadas (firmes o frescas), otras secas (duras) como si no hubieran absorbido el agua y las demás infectadas. (Braham, 1995; Moreno y Zamora, 1978; Neergard, 1979; Camacho 1994).

La germinación en las M2 y M5 (*Abies vejari*) pudo ser afectada por varios factores como que el sustrato utilizado para la prueba de germinación no haya sido el correcto, la dormancia no fue interrumpida con los métodos utilizados (remojo, estratificación en frío), que la semilla hubiera perdido su viabilidad debido al almacenamiento. En la M2 y en la M5 influyó grandemente una plaga que se alimenta en estado larval del embrión de ésta especie, ya que la semilla utilizada en la prueba estaba parasitada aproximadamente en un 70%. Además de que presentó un número considerable de semillas infectadas con hongos y bacterias y pudieron influir en la germinación, ya que las bacterias y hongos en el interior o en la capa externa de la semilla, además de insectos y larvas dentro de las semillas, causan anomalías en los embriones, reducen la calidad y valor de las semillas; aunándose a lo anterior que el promedio de la capacidad germinativa de ésta especie es

típicamente baja (20-50%). (García y Flores, 1993; Hartmann y Kester, 1999 y Franklin, 1974).

Mientras tanto, en *Picea* (M1) en la cual la germinación fue nula, se pudo deber a factores internos (viabilidad y dormancia), además de las causas ambientales, bióticas y la endogamia, que son otros factores importantes que afectan la producción de semillas, el almacenamiento el cual es un factor importante para conservar en buen estado la semilla, a demás de los patógenos presentes en las semillas los cuales unos vinieron de campo y otros se pudieron adquirir en el almacén; agregándole a esto que la germinación actual es muy baja (10-20%) según Safford (1974), aunque la capacidad y energía germinativa se incrementa con el peso específico. Todo lo anterior concuerda con los autores (Hartmann y Kester, 1999; Braham, 1995; Besnier, 1989; Camacho, 1994).

Con las pruebas bioquímicas se llegó a la especie de *Agrobacterium*, la cual fue *tumefaciens* (Schaad, 1994). Las reacciones de las pruebas del diagnóstico fueron las siguientes:

- Oxidación fermentación ----- Oxidativa
- Crecimiento en NaCl 2% ----- +
- Crecimiento a 35°C ----- +
- Sucrosa ----- +
- Erytritol ----- Negativo
- Melezitosa ----- +
- Oxidasa ----- +
- Catalasa ----- +
- Citrato de Amonio férrico ----- Negativo
- Utilización de Citrato ----- +
- Prueba de hipersensibilidad en tabaco ----- +

Solo se reporta género y especie puesto que la bacteria puede mutar muy rápidamente o recombinarse por lo cual se necesitaba probar los medios selectivos 1”A” para Biovar 1, medio 2E para Biovar 2 y medio Roy-Sasser para Biovar 3 y no hubo algunos reactivos.

Las pruebas de patogenicidad realizadas en rodajas de zanahoria y la inoculación en plántulas de tomate, fueron positivas, observándose el desarrollo de callos (Lelliott and Stead, 1987 y Schaad, 1994).

Con las pruebas rápidas de patogenicidad realizadas en papa se presentó la pudrición suave, síntoma de *Erwinia* (Schaad, 1994). No se realizaron pruebas para determinar la especie de éste género, por extravió de cepa.

## CONCLUSIONES

1. - Los patógenos detectados en *Abies vejari* fueron los hongos *Penicillium fuscum*, *Rhizopus stolonifer* y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

2. - Los patógenos detectados en *Pinus culminicola* fueron los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium fuscum*, *Rhizopus stolonifer* y las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia sp.*

3. - Los patógenos detectados en *Picea engelmannii* var. *mexicana* fueron el hongo *Penicillium fuscum* y las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia sp.*

4. - La presencia de estos microorganismos en las semillas si afecta la germinación, principalmente los microorganismos endobióticos y en menor grado los epibióticos.

## RECOMENDACIONES

1. - El método de papel secante para la detección de hongos es el más común, rápido, económico y da buenos resultados.

2. - Para la detección de bacterias los dos métodos empleados dan buenos resultados, el método de papel secante no es utilizado para aislar bacterias, pero los resultados fueron satisfactorios, es más económico, fácil y rápido. El aislamiento en agar es el más utilizado, pero tiene la desventaja de que no todas las muestras crecen sobre un medio y algunos saprófitos que vienen en algunos lotes interfieren al querer recuperar el patógeno, pero se tiene la ventaja de que si no se contamina con saprófitos, el patógeno se encuentra disponible para las siguientes pruebas.

3. - La identificación de especie de las bacterias se llevó a cabo con las pruebas bioquímicas, aunque no es el método más recomendable ya que son complicadas y requieren de mucho tiempo para dar el diagnóstico, pero los resultados obtenidos tienen una alta confiabilidad. Los métodos más rápidos son el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y los métodos serológicos, la desventaja es que no en todos los laboratorios se pueden realizar.

4. - La identificación de las bacterias se debe hacer lo más pronto posible para evitar la mutación de éstas, ya que mutan rápidamente; además de que se evitaría la contaminación con bacterias saprófitas.

5. - Identificar las bacterias saprófitas y ver como influyen en las semillas.

6. - Además de detectar e identificar hongos y bacterias, también sería recomendable realizar esto para otros agentes patológicos como son los virus.

7. - Al detectar alguna semilla en las pruebas de germinación con exudados bacteriales o con micelio, se debe sacar, para evitar que contamine a las demás semillas.

El almacenamiento inadecuado es el principal factor que afecta la viabilidad de la semilla, además de que favorece el desarrollo de microorganismos. Por lo cual se hacen las siguientes sugerencias:

a).- Las semillas del tipo ortodoxas (tolerantes al secado) como es el caso de coníferas deben tener una humedad del 5-10%.

b).- Utilizar desecantes para completar el secado, ya que debido a las condiciones ambientales con el secado al sol no se logra el nivel de humedad requerido en las semillas y para el secado en estufa, se recomiendan temperaturas de 35 a 45°C.

c).- Utilizar recipientes herméticos para impedir cambios en el contenido de humedad; como frascos de vidrio, latas galleteras las cuales se deben sellar con cera de campeche, si se utilizan recipientes de plástico que sean de polietileno de alta densidad (75 a 125 micras) para climas templados y de (75 a 250 micras) para climas tropicales, se deben sellar con calor y presión.

d).- Tener buena ventilación de los cuartos utilizados para el almacenamiento, para evitar la acumulación de humedad, y mantener la temperatura lo más baja posible.

e).- Si se emplea el almacenamiento a bajas temperaturas, utilizando refrigeradores con temperaturas bajo cero, éstas deben permanecer constantes; se debe almacenar la semilla en recipientes o envases impermeables o utilizar el aire o nitrógeno líquido, para un almacenamiento a largo plazo.

f).- Antes de almacenar es recomendable aplicar un fungicida para evitar el desarrollo de hongos, principalmente los de almacén. Los fungicidas recomendados para semillas son el Captan y el Metalaxil.

## BIBLIOGRAFIA

Agarwal, V. K and J.B. Sinclair. 1987, Principles of seed pathology Vol.(I).C.R.C.U.S.A. 176 p.

Alexopoulos, C. J.; C. W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. 4ª edición. John Wiley and Sons, Inc. USA. 869 p.

Andersen, M. A. and Charles, M.L. 1980. Semillas. 7ª. edición. USDA. pp. 804 – 811

Association Official Seed Analysts. 1992. Seedling evaluation handbook. Published by the Association. 100 p.

Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1986. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. McMillan Publishing Company, USA. 218 p.

Besnier, R. F. 1989. Semillas Biología y Tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 637 p.

Bloomberg. 1969. Disease of Douglas Fir Seeds During Cone Storage. Forest Science. Volume 15, Number 2 , P: 176-181.

Braham, S. S. 1995. Regeneración Natural de *Picea engelmannii* var. *Mexicana* en Arteaga, Coah. y Rayones, N.L. Tesis. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. 74 p.

Braham, S. S. 1999. Comunicación personal. Maestro Investigador. Departamento de Forestal. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah.

Camacho, M. F. 1994. Semillas Forestales. Publicación especial. INIFAP. 137 p.

Capó A., M.A. 1972. Observaciones sobre la taxonomía y Distribución de las coníferas de Nuevo León, México. Tesis. UANL. Monterrey, N. L. México. 191 p.

Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology. Second edition, McMillan Publishing Company. USA. 321 p.

Cuisance, P. 1988. La Multiplicación de las Plantas y el Vivero. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 165 p.

De la Garza, G. J. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Marín , N. L. 556 p.

Dhingra, O. and J. B. Sinclair. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Second edition. Lewis Publishers. USA. 434 p.

Flores, L. C. 1999. Comunicación personal. Maestro Investigador. Departamento de Forestal. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah.

Franklin, J. F. Seeds of Woody Plants in the United States Forest Service. Agriculture Handbook No. 450. Department of Agriculture, Washington, D. C. 883 p.

García, A. A. y Ms. E, González. 1998. Pináceas de Durango. Instituto de Ecología A.C. Durango, Dgo. 179 p.

García, M. J. Y J. M. Flores. 1993. Guía para la producción de planta forestal en envases. Guía técnica No. 3. INIFAP.

Hansen, M. E. and J. K. Lewis. 1997. Compendium of Conifer Diseases. The American Phytopathological Society. USA. 101 p.

Hartmann, H. T. y D. E. Kester. 1999. Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. 7ª Reimpresión. Editorial CECSA. 733 p.

Hoekstra, P. E. , E. P. Merkel, and H. R. Powers. 1961. Production of Seeds of Forest Trees. USDA. Washington, D.C. 591 p.

Horsfall, J. G. and E. B. Cowling. 1978. Plant Disease. Vol. III Academic Press, Inc. USA. 487 p.

ISTA. 1959. Deliberaciones de la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas. Vol. 24. Centro Regional de Ayuda técnica; Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). Editorial Rabasa, S.A. México, D.F. 128 pp.

ISTA. 1979. Handbook for Seedling Evaluation. Zurich, Switzerland. 129 p.

ISTA. 1985. International Rules for Seed Testing, Seed, Sci and Technol, 13(2): 366-520, The Nether Lands.

Krugman, S.L; Stain, W.I. y D.M. Schmitt. 1974. Seed biology In. Seeds of Woody plants in the United States, Agriculture. Handbook No.450. USDA. Forest Service. Washington, D.C. pp. 21-34.

Lelliott, R. A. and D. E. Stead. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. British Society for Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne. 211 p.

Lemus, S. J. 1999. Maduración de Conos, producción y viabilidad de la semilla de *Pinus catarinae* M.F. Robert-Passini. Tesis. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah.

Madrigal, S. X; L. Vela, G y JA. Pérez, D. 1993. Árboles de zonas templadas: Coníferas. Memoria del XXX Aniversario del Herbario Nacional Forestal y de la VII reunión Nacional de Encargados de Herbario. INIFAP. pp.73-99.

Martínez, M. 1953. Las Pináceas Mexicanas. Secretaria de Agricultura y Ganadería. Subsecretaria de Recursos Forestales y de Caza. México, D. F. 363 p.

Masao, Goto. 1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Ed. Academic Press. Inc. San Diego, California. USA. 342 p.

Moreno, M. E. 1976. Manual para el análisis de semillas. Pronase. SAG. 197 p.

Moreno, M.E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F. 383 p.

Moreno, M.E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. México, D.F. 109 p.

Moreno, M.E. 1996. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. 3ra. edición. Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. 393 p.

Moreno, M.E. y J. Zamora. 1978. Guía para evitar problemas causados por hongos en semillas y granos almacenados. Merk Sharp y Dohme México. P: 1- 23

Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. Vol. I. McMillan Press. Ltd. London. 839 p.

Niembro, R.A. 1980. Estructura y Clasificación de Semillas de Especies Forestales Mexicanas. UACH. México, D.F. p.13

Niembro, R. A. 1988. Semillas de árboles y arbustos. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. 285 p.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. Diario Oficial de la Federación.

Patiño, V. F. 1973. Floración, Fructificación y Recolección de Conos y Aspectos. Bosques y Fauna. México. P: 20-30.

Patiño, V.F; Garza, L.M.P de la; Villagómez, A.Y; Talavera, A.I. y Camacho,M.F. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas. INIFAP. Boletín divulgativo No. 63 México. 181 p.

Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. USA. 231 p.

Pitt, J.I and Hocking, A.D. 1985. Fungi and Food spoilage. Academic Press. New York USA. P: 143-167.

Popovich, S. J; W. D. Shepperd; D. W. Reichert and M. A. Cone. 1993. Flora of the Fraser Experimental Forest, Colorado. USDA Forest Service. USA. 62 p.

Quick, R. C. 1984. Semillas. 9ª. Edición. USDA. pp. 181-190.

Randhawa, P. 1995. Theory and Principals Seedborne Bacteria and their Detection. I Curso Taller Internacional sobre métodos para la detección de patógenos en semillas. Memorias. Buenavista, Saltillo, Coah. México.

Riskind, D. H. and T. F. Patterson. 1975. Distributional and ecological notes on *Pinus culminicola*. Madroño 23: 159 –161.

Robins, J. A. y Ochoa, M. 1983. En: Reunión sobre problemas en semillas forestales tropicales. Tomo III. SARH. P: 45-51.

Rodríguez, M. Ma. L. 1994. Manual de Identificación de Bacterias Fitopatógenas. UACH. Texcoco, México. 144 p.

Rudolf, P. O. 1984. Semillas. 9ª Edición. USDA. p: 407 – 417.

Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Editorial Limusa. México, D.F. 397 p.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa, S.A. México, D.F. 432 p.

Safford, O. L. 1974. Seeds of Woody Plants in the United States Forest Service. Agriculture Handbook No. 450. Department of Agriculture. Washington, D.C. 883 p.

Schaad, N. W. 1994. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2<sup>nd</sup> Edition. Apspress Tha American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 169 p.

Saettler, W.A; N.W. Schaad and D.A. Roth. 1989. Dtection of Bacteria in Seed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 126 p.

Suzan, A. H., G. S. Ramos y S. L. Pineda. 1991. IV Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. Universidad Autónoma de Tamaulipas, COTACYT y Universidad Autónoma de Nuevo León. 150 p.

Taylor, R. J. y Patterson, T. F. 1980. Biosystematics of mexican spruce species and populations. Taxon 29 (4): 421-469.

Vázquez, C. I. y A. M. Pineda. 1989. V Simposio sobre Parasitología Forestal. Sociedad Mexicana de Entomología, A.C; Academia Nacional de Ciencias Forestales, A.C; ESAHE y SARH. Cd. Juárez, Chihuahua. 90 p.

Vera, L.C. , T.F. Swofford y R.P. Moore. 1984. Semillas. 9ª edición. USDA. P: 771- 786.

Wang, P. B y T. Beardmore. 2000. Almacenamiento y manejo de germoplasma. Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal. SEMARNAP. México. 100 p.

Warham, E.J. Et al. S/A. Ensayos para las Semillas de Maíz y Trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. 84 p.